

Cell turnover and immune cell activation: key factors in the control of plaque progression and phenotype in atherosclerosis?

Citation for published version (APA):

Lutgens, E. (2001). *Cell turnover and immune cell activation: key factors in the control of plaque progression and phenotype in atherosclerosis?* [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20010215el>

Document status and date:

Published: 01/01/2001

DOI:

[10.26481/dis.20010215el](https://doi.org/10.26481/dis.20010215el)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Atherosclerosis is the leading cause of morbidity, disability and mortality in the developed world. Despite our familiarity with the clinical symptoms of the disease, its pathogenesis remains poorly understood. Two mechanisms that are considered to play a major role in atherosclerosis are changes in cell turnover (DNA-synthesis and apoptosis) and chronic inflammation.

In the present thesis we focused on these two mechanisms. In the first part we hypothesized that the level, distribution pattern and phenotype of DNA-synthesizing and apoptotic cells change during the diverse stages of atherosclerosis. In addition, we expected that Gas6 deficiency (a gene important in cell survival) would suppress DNA-synthesis and promote apoptosis, thereby resulting in smaller atherosclerotic plaques. The second part of this thesis focuses on the role of inflammation in lesion initiation and progression. Although many papers report an important role for the diverse inflammatory parameters in atherosclerosis, a key regulator of inflammation in atherogenesis is not known. We hypothesize that CD40-CD40L interactions, interactions important in immune- and inflammatory responses, play a key role in atherosclerosis. Therefore, we expected that inhibition of CD40-CD40L interactions would inhibit lesion initiation and progression.

In chapters 2 and 4, we characterized the initiation and progression of atherosclerotic lesions, as well as the effects of atherosclerosis on the entire vascular wall in two mouse models of atherosclerosis. The first part of chapter 2 describes the age and diet dependent progression of atherosclerosis in the ApoE*3Leiden mouse. We report that ApoE*3Leiden mice show a cranio-caudal lesion progression. Atherosclerotic lesions range from type I (a few macrophage derived foam cells) to type V (lesions containing a lipid core and a fibrous cap). Immunohistochemistry revealed the presence of macrophages, SMCs, endothelial cells and T-lymphocytes in these lesions. Ruptured plaques (type VI), or plaques containing intra-plaque hemorrhage were however not observed.

In chapter 4, we investigated the response of the vascular wall (vascular remodeling) to atherosclerotic lesion progression in ApoE*3Leiden mice and ApoE-/- mice. In both mouse models, the carotid arteries, thoracic and abdominal aorta show compensatory enlargement in response to plaque progression. Enlargement was predominantly observed in advanced type IV and V lesions, most prominently in ApoE-/- mice. Despite the presence of compensatory enlargement,

lumen diameter decreased and significant stenosis (>70%) developed, but only in the carotid arteries. Constrictive remodeling, as well as ischemic organ damage was not observed.

In chapters 2 and 3, we describe the level, distribution pattern and phenotype of DNA-synthesizing and apoptotic cells in atherosclerosis. Chapter 2 describes these phenomena in ApoE*3Leiden mice. In these mice, DNA-synthesis is highest in early type II lesions. Most DNA-synthesizing cells were located in the media. When atherosclerotic lesions progressed to type III-V lesions, DNA-synthesis shifted to the shoulder region, and its level decreased. Apoptosis was only observed in advanced atherosclerotic lesions. Levels were low, and apoptotic cells were predominantly observed in the lipid core and regions adjacent to the lipid core. In all lesion types, both DNA-synthesis and apoptosis were mostly confined to the macrophage.

Chapter 3 describes the same parameters in human atherosclerosis. Also in human atherosclerosis, DNA-synthesis peaked in early type II lesions to decrease in type V lesions. Interestingly, a second peak in DNA-synthesis was observed in type VI lesions (ruptured plaques). DNA-synthesis was mostly confined to the macrophage or, in type VI lesions, to macrophages and T-lymphocytes. As in mice, apoptosis was elevated only in advanced lesions in the lipid core or in regions adjacent to the lipid core. Most apoptotic cells were macrophages, although a significant amount were SMCs in the fibrous cap.

In conclusion, DNA-synthesis is an early phenomenon, whereas apoptosis is a late phenomenon of atherosclerosis. Furthermore, cell turnover is mostly confined to the macrophage.

In chapter 5, we describe the effect of deficiency of Gas6 on atherosclerosis. Gas6 is known as a survival factor, which inhibits apoptosis and stimulates DNA-synthesis in serum starved fibroblasts. Although we expected to find smaller lesions due to decreased levels of DNA-synthesis and elevated levels of apoptosis, none of this was true. Interestingly, Gas6^{-/-}/ApoE^{-/-} mice developed a differently organized atherosclerotic plaque phenotype. These atherosclerotic lesions consisted of increased amounts of collagen and SMCs. However, compared to ApoE^{-/-} mice, both SMCs and collagen fibers of Gas6^{-/-}/ApoE^{-/-} mice were distributed throughout the entire lesion. Furthermore, lesions of Gas6^{-/-}/ApoE^{-/-} mice were composed of multiple lipid cores. However, the most remarkable finding of this study was the development of intra-plaque hemorrhage in Gas6 deficient mice. Intra-plaque bleeding, associated with iron deposition and fibrin formation was observed in >50% of the advanced lesions.

The second part of this thesis focuses on the role of inflammation in atherosclerosis, especially on the role of the CD40-CD40L system. In chapter 6, we report that deficiency of the CD40L gene in ApoE^{-/-} mice results in a 5.5-fold decrease in plaque area. Furthermore, deficiency of CD40L caused the development of a lipid-poor, collagen- and SMC rich plaque phenotype, with a decreased T-lymphocyte content, features of a stable atherosclerotic plaque phenotype. In a follow-up study, described in chapter 7, we obtained similar results using a pharmacological approach. Although we did not observe a decrease in plaque area, both early and delayed treatment with an anti-CD40L antibody resulted in the same lipid-poor, collagen-rich, stable atherosclerotic plaque phenotype. Interestingly, anti-CD40L antibody treatment induced upregulation of TGF β .

In chapter 8, the findings of this thesis are discussed. The first part of chapter 8 discusses the importance of DNA-synthesis and apoptosis on plaque progression and plaque phenotype. The second part discusses the role of inflammation, and the role of the CD40-CD40L system in particular in atherosclerosis. Furthermore, several mechanisms, responsible for the CD40L inhibition induced stable plaque phenotype are postulated.

In conclusion, the role of cell turnover in primary atherosclerosis remains questionable. Although our data show an interesting pattern of cell turnover during atherogenesis, our intervention studies (both *gas6* and CD40L inhibition) reveal that the contribution of cell turnover in lesion initiation and progression is limited. On the other hand, this thesis confirms the important role of inflammation (and especially the CD40-CD40L interactions) on plaque progression and phenotype. The CD40-CD40L system is an interesting therapeutic target, since its inhibition results in the development of a stable atherosclerotic plaque phenotype. However, precise mechanisms, responsible for the development of this phenotype still remain to be elucidated.

Samenvatting

Atherosclerose (aderverkalking) is een systemische aandoening van de grote slagaders die ieder mens in meer of mindere mate treft. In de Westerse maatschappij zijn de gevolgen van atherosclerose doodsoorzaak n°1. Klinische complicaties van atherosclerose omvatten o.a. het myocardinfarct, herseninfarct en klachten van perifere arterieel vaatlijden. Ondanks de klinische bekendheid met de gevolgen van atherosclerose, is de pathogenese van atherosclerose nog altijd slecht begrepen. Twee mechanismen waarvan men denkt dat deze een belangrijke rol spelen in de ontwikkeling en progressie van atherosclerose zijn "cell turnover" (DNA-synthese en apoptose) en chronische ontstekingsactiviteit.

In dit proefschrift zijn deze mechanismen verder onderzocht. In het eerste deel van dit proefschrift is de hypothese dat 'het niveau, het verdelingspatroon en het fenotype van DNA-synthetiserende en apoptotische cellen verandert in de verschillende stadia van atherosclerose' in zowel muizen als mensen getoetst. Verder worden de effecten van een genetische interventie met Gas6, een gen dat een belangrijke rol speelt bij cel overleving beschreven. In deze studie hadden we verwacht dat afwezigheid van Gas6 zou leiden tot een verminderde DNA-synthese en toegenomen apoptose, waarbij atherosclerose zou afnemen. Het tweede deel van dit proefschrift beschrijft de effecten van ontsteking in atherosclerose. Hoewel de belangrijke rol van chronische ontsteking in atherosclerose in vele artikelen beschreven wordt, zijn belangrijke regulatoren van de ontstekingscascade in atherosclerose nog grotendeels onbekend. In dit proefschrift hebben we de hypothese opgesteld dat CD40-CD40L interacties, een systeem bekend van zijn rol in het immuunsysteem, een sleutelrol spelen in atherosclerose. Daarom verwachtten we dat remming van CD40L zou resulteren in een vermindering van atherosclerose.

In hoofdstuk 2 en 4 worden plaque initiatie en progressie, alsmede de effecten van atherosclerose op de gehele vaatwand beschreven in 2 veelgebruikte muizenmodellen van atherosclerose. Het eerste deel van hoofdstuk 2 beschrijft de leeftijds- en dieet- afhankelijke progressie van atherosclerose in de ApoE*3Leiden muis. We laten zien dat ApoE*3Leiden muizen een cranio-caudale progressie van atherosclerose vertonen. Atherosclerotische plaques varieerden van type I lesies (enkele schuimcellen) tot type V lesies (met een necrotische kern en een fibreuze kap). Immunolabeling liet zien dat deze plaques waren opgebouwd uit macrofagen,

gladde spiercellen, endotheelcellen en T-lymfocyten. Plaque-rupturen, of intra-plaque bloedingen werden echter niet waargenomen.

In hoofdstuk 4 beschrijven we de effecten van atherosclerose op de gehele vaatwand (remodelering) in ApoE*3Leiden muizen en ApoE^{-/-} muizen. In beide modellen laten de carotiden, thoracale en abdominale aorta compensatoire vergroting zien als reactie op plaque ontwikkeling en progressie. Dit was met name het geval in gevorderde type IV en V lesies van ApoE^{-/-} muizen. Ondanks het ontwikkelen van compensatoire vergroting, nam de lumenale diameter af en ontstonden er stenoses van meer dan 70% in de carotiden. Echter, vasculaire constrictie, noch ischemische schade werden waargenomen.

In hoofdstuk 2 en 3 beschrijven we de hoeveelheid, verdeling en het fenotype van DNA-synthetiserende en apoptotische cellen in de diverse stadia van atherosclerose. In hoofdstuk 2 worden deze parameters beschreven in de ApoE*3Leiden muis. In deze muizen werd een DNA-synthese piek waargenomen in vroege type II lesies (fatty streaks), waarbij de meeste DNA-synthetiserende cellen in de media waren gelegen. Vanaf de ontwikkeling van type III lesies verschoof de DNA-synthese naar het schoudergebied van de plaque, en daalde de hoeveelheid. Apoptose daarentegen werd alleen in de late lesies gezien. De hoeveelheid apoptotische cellen was laag, en deze cellen werden voornamelijk gezien in de necrotische kern en zijn aangrenzende gebieden. In alle typen plaques waren zowel DNA-synthese als apoptose voornamelijk beperkt tot de macrofaag.

Hoofdstuk 3 beschrijft dezelfde fenomenen in humane atherosclerose. Ook in humane atherosclerotische lesies werd een DNA-synthese piek waargenomen in type II lesies. Verder werd er een tweede piek in DNA-synthese gezien in type VI lesies (geruptureerde plaques). DNA-synthetiserende cellen waren m.n. macrofagen en, in de geruptureerde plaques ook T-lymfocyten. Net als in muizenplaques was apoptose alleen verhoogd in vergevorderde plaques. Het grootste gedeelte apoptotische cellen was van macrofaag origine en was gelegen in de necrotische kern. Echter, een aanzienlijk deel van de apoptotische cellen waren gladde spiercellen in de fibreuze kap.

In hoofdstuk 5 worden de effecten van Gas6-deficiëntie in atherosclerose beschreven. Gas6 is een 'survival factor' die apoptose remt, en DNA-synthese stimuleert. We hadden daarom verwacht dat gas6 deficiëntie in een atherosclerotisch muizenmodel zou leiden tot kleinere atherosclerotische plaques. Echter, niets bleek minder waar. Gas6^{-/-}/ApoE^{-/-} muizen hadden een vergelijkbaar

DNA-synthese en apoptose patroon, maar ontwikkelden een anders georganiseerde plaque. Plaques van Gas6-/-/ApoE-/- muizen bevatten meer gladde spiercellen, en meer collageen. Echter, gladde spiercellen waren door de gehele atherosclerotische plaque verspreid, en er werden jongere vormen van collageen waargenomen. Verder toonden de Gas6-/-/ApoE-/- muizen meerdere necrotische gebieden per lesie. Echter, de meest opmerkelijke bevinding van deze studie was het ontstaan van intra-plaque bloedingen in de Gas6-/-/ApoE-/- muizen. Deze intraplaque bloedingen waren geassocieerd met fibrine-formatie en ijzerdepositie, en werden in >50% van de vergevorderde lesies gevonden.

Het tweede deel van dit proefschrift beschrijft de rol van ontsteking in de atherogenese, met speciale aandacht voor het CD40-CD40L systeem. In hoofdstuk 6 beschrijven we dat deficiëntie van het CD40L gen in ApoE-/- muizen resulteert in een 5.5-voudige afname van plaque oppervlak. Niet alleen was het plaque oppervlak afgenomen, ook vertoonden deze plaques kenmerken van een stabielere plaque fenotype. Deze plaques hadden o.a. een kleine necrotische kern, en bevatten veel collageen en gladde spiercellen. In een farmacologische follow-up studie, beschreven in hoofdstuk 7, verkregen we soortgelijke resultaten. Alhoewel we geen afname van het plaque oppervlak zagen, resulteerde vroege en late anti-CD40L antilichaam behandeling in hetzelfde lipide-arme, collageen- en gladde spiercel-rijke atherosclerotische plaque fenotype. Verder vertoonden deze lesies een verhoogde expressie van TGF β .

In hoofdstuk 8 worden de bevindingen van dit proefschrift bediscussieerd. In het eerste deel wordt het belang van DNA-synthese en apoptose beschreven, terwijl het tweede deel zich richt op beschrijving van een eventueel toekomstige rol van anti-CD40L antilichaam behandeling in de toekomst. Verder wordt over het mechanisme nagedacht, aan de hand van preliminaire resultaten verkregen met een cDNA expressie array.

Concluderend: of DNA-synthese en apoptose een belangrijke rol spelen in atherosclerose blijft nog maar de vraag. Hoewel onze data een interessant patroon van DNA-synthese en apoptose laten zien, laten onze interventiestudies (zowel gas6 als CD40L inhibitie), slechts een beperkte rol voor DNA-synthese en apoptose in de initiatie en progressie van atherosclerose zien. Inflammatie (en met name het CD40-CD40L systeem) blijkt echter een veel grotere rol te spelen in plaque progressie en fenotype. Aangezien het CD40-CD40L systeem resulteert in de ontwikkeling van een

stabiel atherosclerotisch plaque fenotype, is dit systeem potentieel aantrekkelijk voor therapeutische doeleinden. Echter, het exacte mechanisme dat verantwoordelijk is voor de ontwikkeling van het stabiele plaque fenotype na CD40L inhibitie zal nog opgehelderd moeten worden.